クローニング実験ハンドブック

ー保存版ー

★ライゲーションの基本から
ディレクショナルクローニングまで★

（2014年4月改訂版）
（2015年4月価格改定を反映）

目次

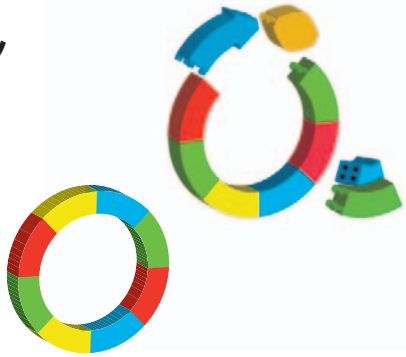
クローニング実験（操作の流れ）

- 制限酵素／ライゲーション
- TAクローニング
- In-Fusionクローニング

cDNA合成

核酸精製

アガロースゲル電気泳動



that's GOOD science!™

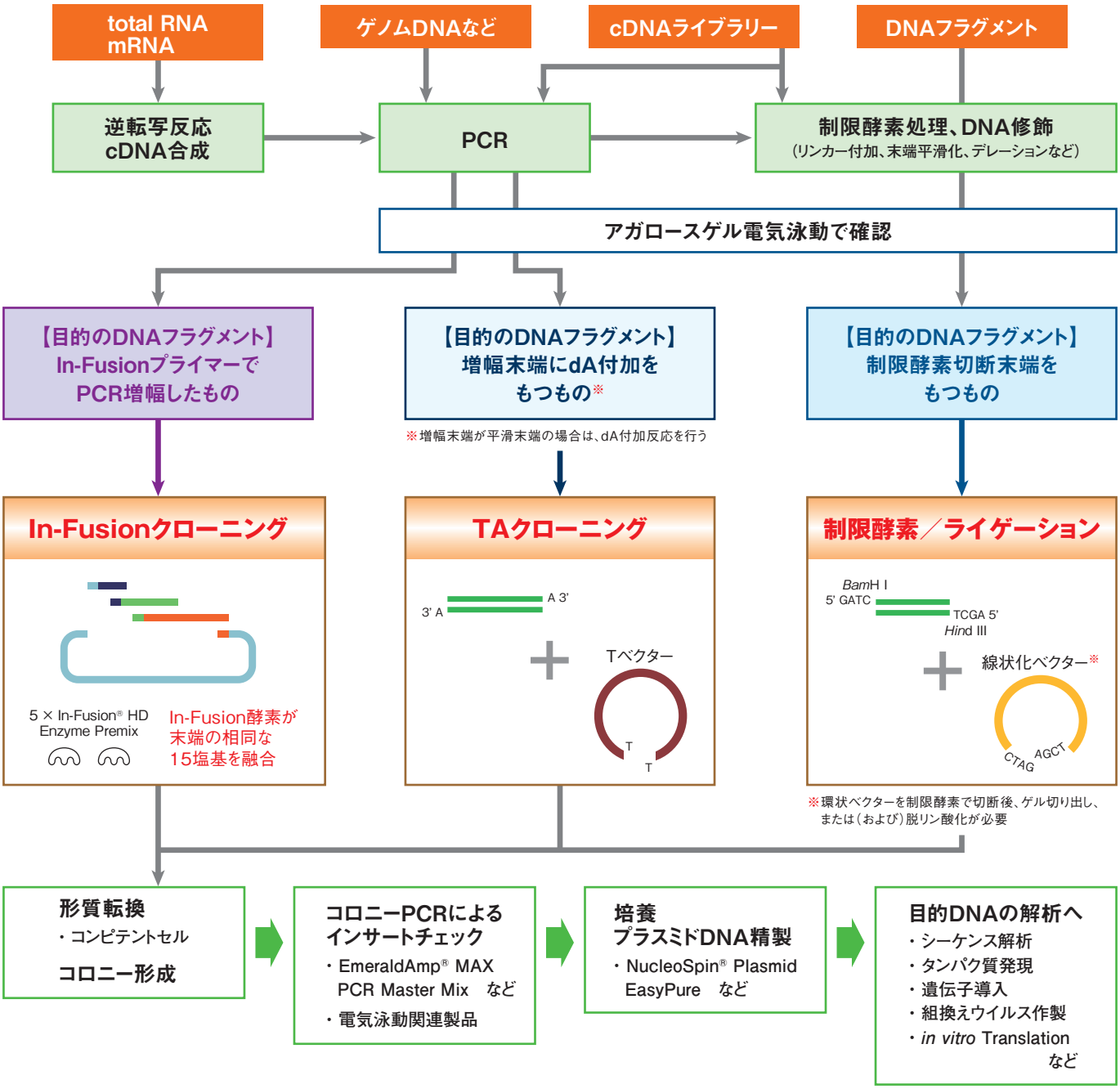
クローニング実験の手引き

目的のDNA（ターゲット配列）を任意のベクターに載せるクローニング操作は、遺伝子工学実験の基礎技術の一つであり、現在も様々な研究場面で利用されています。
制限酵素の発見とその応用により、クローニングは汎用性の高い手法として浸透しましたが、近年では制限酵素処理をベースとしないクローニング方法（TAクローニング法やIn-Fusion法）の開発により、さらに自由度の高いクローニングが可能になっています。
また、クローニングを行うには、サンプルからのゲノムDNAやRNAの抽出・精製、mRNAからの逆転写反応によるcDNA合成、PCRによるDNA断片の増幅などを組み合わせて、目的DNA断片を取得することも重要なステップです。

本ハンドブックでは、制限酵素を用いたオーソドックスなクローニング法や汎用的なTAクローニング法、最新のクローニング手法であるIn-Fusionクローニング法に加え、クローニングの前後に必要な各種実験操作（DNA精製、cDNA合成、PCR、コロニーPCRなど）も併せて、操作方法の概要を紹介しています。

クローニングを初めて行う方からある程度経験されている方まで、多くの研究者の皆様に役立つ内容を載せた『クローニング実験ハンドブック』を、お手元に置いてどうぞご活用ください。

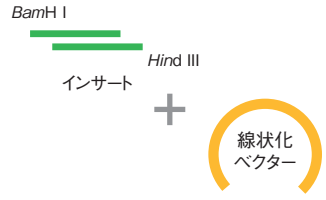
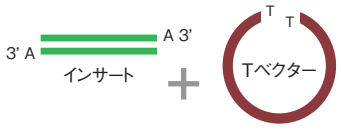
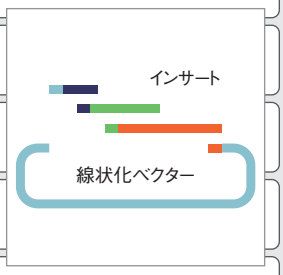
クローニング操作の基本的な流れ



■ インサートとベクターの調製

クローニング方法	インサートDNA断片の末端構造	ベクター調製
制限酵素／ライゲーション	DNA断片の両端に制限酵素認識部位を形成させる必要がある。異なる制限酵素認識部位を利用すれば方向を決めた挿入ができる。	DNA断片の両端に対応する制限酵素で処理。切断後、精製や脱リン酸化が必要な場合がある。
TAクローニング	3’末端にdAを付加するPCR酵素で反応を行う、あるいは平滑末端の増幅産物にdAを付加する反応が必要。挿入の方向は決められない。	3’末端にdTを付加した市販ベクターを利用。
In-Fusionクローニング	ベクターの末端15塩基と相補的な配列を付加したPCRプライマーで、目的遺伝子を増幅する。任意のベクターで方向を決めた挿入が可能。	任意のベクターで使用可能。制限酵素処理、またはPCR増幅により線状化するだけ。

■ 実験目的別 お勧めのクローニングキット

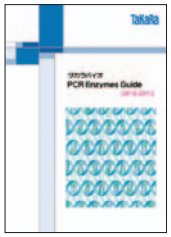
実験目的		お勧めのキット	製品情報掲載ページ
ライゲーションを行いたい 	迅速・高効率なライゲーション	DNA Ligation Kit〈Mighty Mix〉	P4
	平滑末端のライゲーション	Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)	P6
	長鎖のインサート（>10 kb）をライゲーション	TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	P4
TAクローニングを行いたい 	インサートの3’末端にはdAが付加している	Mighty TA-cloning Kit	P6
	インサートが平滑末端のためdAの付加が必要	Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®	P6
迅速・高効率にクローニングしたい 複数断片を一度にクローニングしたい ディレクショナルにクローニングしたい 制限酵素サイトがない位置に挿入したい 発現ベクターなので余分な付加は避けたい 		In-Fusion® HD Cloning Kit 相同配列の融合により、目的遺伝子のPCR断片を簡単にクローニング ・任意のベクターの任意の位置に挿入可能 ・余分な配列をいっさい付加しない ・In-Fusion反応はわずか15分 ・もちろん高効率クローニング ・複数DNA断片、長鎖DNA断片もOK	P8

■ クローニング関連製品 ガイドブック

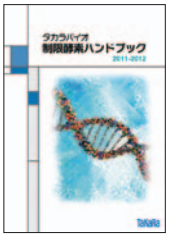
クローニング実験に関連する製品の詳しい内容は、以下のパンフレットまたはウェブサイトをご参照ください。

逆転写酵素 PrimeScriptシリーズ

PCR Enzymes Guide



制限酵素ハンドブック



In-Fusion HD Cloning Kit

核酸電気泳動 関連製品ガイド

DNA/RNA Clean-upガイド

制限酵素／ライゲーションによるクローニング

目的のDNA断片を目的のベクタープラスミドに載せるクローニング操作は遺伝子工学実験の基本です。
ここでは制限酵素とT4 DNAリガーゼ（DNA Ligation Kit）を用いたクローニング操作を解説します。

操作方法の概要

1.インサートDNAの準備（目的のDNA断片の調製）

(a) 制限酵素での切り出し

あらかじめ目的DNA断片の制限酵素切断箇所を確認し、次に使用するベクタープラスミドのクローニングサイトに合わせて、切り出しに使用する制限酵素を選定する。
★Takara Cut-Site Navigator（次ページ）が便利です。

制限酵素*Hind* IIIと*Bam*H Iでのdouble digestionの例

①反応液を調製する。

基質DNA	（≦ 1 μg）
Hind III	1 μl
*Bam*H I	1 μl
10 × K Buffer	2 μl
滅菌蒸留水	up to 20 μl（軽くタッピングして混合）

↓

②37℃で1時間 反応

↓

③反応液の半分（10 μl程度）にLoading Bufferを加えてアガロースゲル電気泳動を行い、切断を確認する。

↓

④目的DNA断片のバンドを含むゲルを切り出す。
★DNAの損傷を抑えるため、UV照射は短時間で行う。

↓

⑤NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて、ゲルからDNAを精製（ゲル抽出操作手順は10ページを参照）

↓

⑥ インサートDNA溶液[A]とする。

(b) PCRによる増幅

ベクターとの連結に使用する制限酵素切断部位を5'側に付加※したプライマーを用いて、インサートDNAのPCR増幅を行う。
※制限酵素切断部位＋さらに5'側に3塩基以上を付加

Tks Gflex® DNA Polymeraseを使用した例

①PCR

2 × Gflex PCR Buffer（Mg^{2+}, dNTP plus）	25 μl
Forward Primer	0.2 ～0.3 μM（final conc.）
Reverse Primer	0.2 ～0.3 μM（final conc.）
鋳型DNA	<500 ng
Tks Gflex DNA Polymerase	1.25 U
滅菌蒸留水	up to 50 μl（軽くタッピングして混合）

94℃ 1 min.
↓
98℃ 10 sec.
60℃ 15 sec.
68℃ 30 sec./kb
] 30 cycles

↓

②PCR産物の精製
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて増幅産物を精製する（10ページを参照）。

↓

③制限酵素反応により両端を切断（必要に応じてスケールアップ）

上記精製済みPCR産物	≦ 2 μl
Hind III	1 μl
*Bam*H I	1 μl
10 × K Buffer	2 μl
滅菌蒸留水	up to 20 μl（軽くタッピングして混合）

↓

④37℃で1時間 反応

↓

⑤NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて、ゲルからDNAを精製（10ページを参照）

↓

⑥回収した溶液をインサートDNA溶液[A]とする。

2.ベクタープラスミドの準備

①目的のベクタープラスミド（環状）のクローニングサイトを制限酵素で切断【ベクターの線状化】

ベクタープラスミドDNA	（≦ 1 μg）
Hind III	1 μl
*Bam*H I	1 μl
10 × K Buffer	2 μl
滅菌蒸留水	up to 20 μl（軽くタッピングして混合）

↓

②37℃、1時間 反応

↓

③NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて、反応液からDNAを精製（10ページを参照）

↓

④回収した溶液をプラスミドDNA溶液[B]とする。

! 1種類の制限酵素でインサートDNAの調製、ベクタープラスミドの線状化を行う場合は、線状化したベクターのセルフライゲーションを防止するため、下記の脱リン酸化処理を行う。

脱リン酸化処理（セルフライゲーションの防止）

制限酵素処理済みベクタープラスミド	1～20 pmol
Alkaline Phosphatase（BAP）	0.3～0.6 U
10 × BAP Buffer	5 μl
滅菌蒸留水	up to 50 μl（軽くタッピングして混合）

↓

37～65℃で30分間反応

↓

フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25:24:1）抽出（2回）

↓

クロロホルム／イソアミルアルコール（24:1）抽出（1回）

↓

エタノール沈殿

↓

TE Buffer（20 μl以下）に溶解し、プラスミドDNA溶液[B]とする。

★5'-突出末端の脱リン酸化はCIAP（Calf Intestinal Alkaline Phosphatase）による処理でも十分ですが、平滑末端や3'-突出末端の脱リン酸化にはBAP（Bacterial Alkaline Phosphatase）の使用を推奨します。

3. インサートDNAと線状化プラスミドのライゲーション

DNA Ligation Kit〈Mighty Mix〉使用の場合

インサートDNA溶液[A]	25～250 fmol
プラスミドDNA溶液[B]	50 ng(25 fmol)
Ligation Mix	7.5 μl
滅菌蒸留水	up to 15 μl

↓

16℃、30分反応(または25℃、5分反応)

4. 形質転換

E. coli HST08 Premium Competent Cells使用の場合

①HST08コンピテントセル100 μlを使用直前に氷上で融解して穏やかに混和後、14 ml丸底チューブに移す(ボルテックス不可)。

↓

②ライゲーション反応後の溶液10 μlを加え、氷中30分間放置

↓

③42℃で 45秒間インキュベート後、氷中1～2分間放置

↓

④あらかじめ37℃に保温したSOC培地を最終1 mlになるように加える。

↓

⑤37℃で1時間振とう(160～225 rpm)

↓

⑥LB選択プレートに適当量まき、37℃で一晩静置

5. インサートチェックPCR
6. 培養、プラスミド精製

インサートチェックPCRは5ページを、プラスミド精製は10ページを参照

よくある質問

【Q1】ライゲーションが起こりにくく、形質転換効率が悪いときに注意する点は?

【A1】

・ライゲーション反応時間を延長してください。

・DNA溶液の塩濃度が高いとライゲーション効率が低下します。特にエタノール沈澱時の酢酸アンモニウム塩は阻害作用を示しますので、エタノール沈澱の際には塩が残らないよう、丁寧に洗浄操作を行ってください。

・DNA抽出キットを使用した場合、抽出液のエタノール沈澱を行いバッファー交換することで、ライゲーション効率が改善することがあります。

・突出末端のライゲーションの場合、DNA溶液(ベクター+インサートDNA)を60～65℃で2～3分加温後、急冷してからLigation Kitの各試薬を加え反応を行って下さい。ライゲーションに有効な突出末端が確保され、形質転換効率が改善されることがあります。

以上の操作で改善されない場合はDNAの再精製を推奨します。

【Q2】長鎖のクローニングで気をつける点は?

【A2】長鎖になるほどライゲーション効率が低下する傾向があります。TaKaRa DNA Ligation Kit LONG(製品コード 6024)は長鎖DNAのライゲーションに最適化してあり、10 kb以上のライゲーションを行う場合に威力を発揮します。

また、インサートDNAを含めたプラスミドの全サイズが大きい場合(特に10 kbを超える場合)は大腸菌への導入効率が低くなり、大腸菌内でのプラスミドの安定性も低下することがあるため、欠失したクローンになる確率が高くなります。大きなサイズのDNAを効率よく形質転換できる*E. coli* HST08 Premium Competent Cells(製品コード 9128)の使用をお勧めします。

タカラバイオウェブサイト上の制限酵素認識配列検索ツール

Takara Cut-Site Navigator

DNA配列を読み込んで条件を設定すると、切断サイトを一覧や模式図、配列の詳細で表示できます。

【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
制限酵素、脱リン酸化	*Hind* III	10,000 U	1060A	￥6,700
	*Bam*H I	10,000 U	1010A	￥6,700
	Alkaline Phosphatase(*E. coli* C75)	50 U	2120A	¥11,000
	Alkaline Phosphatase(Calf intestine)	1,000 U	2250A	¥11,000
PCR	Tks Gflex® DNA Polymerase	250 U	R060A	¥31,500
ライゲーション、形質転換	DNA Ligation Kit〈Mighty Mix〉	1 Kit	6023	¥27,000
	TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 Kit	6024	¥27,000
	E. coli HST08 Premium Competent Cells	1 Set(100 μl × 10)	9128	¥22,000
	E. coli JM109 Competent Cells	1 Set(100 μl × 10)	9052	¥20,000
DNAクリーンアップ	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ※	10回	740609.10	¥5,300
プラスミド精製	NucleoSpin® Plasmid EasyPure ※	10回	740727.10	¥4,200
電気泳動	Agarose L03「TAKARA」	100 g	5003	¥17,000
	100 bp DNA Ladder	500 μl(100回)	3407A	¥19,000
	λ-*Hind* III digest	100 μg	3403	¥8,500

※マッハライ・ナーゲル社の製品です。

TAクローニング

Taq DNA Polymeraseなどの PCR酵素による増幅産物は、その3'末端にデオキシアデノシン(dA)が一塩基付加されています。TAクローニングでは、3'末端にデオキシチミジン(dT)を一塩基付加したTベクターを使用し、PCR増幅産物のdA一塩基突出部分と相補的となることを利用して簡便にクローニングを行います。(インサートDNAの5' 末端のリン酸化は不要です。)

操作方法の概要

1.インサートDNAの準備(目的DNA断片の調製)

①PCRによる増幅(*TaKaRa Ex Taq*®使用の場合)

10 × *Ex Taq* Buffer(Mg^{2+} plus)	5 μl
dNTP Mixture(各2.5 mM)	4 μl (各 200 μM)
Forward Primer	0.2〜1 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2〜1 μM (final conc.)
鋳型DNA	< 500 ng
TaKaRa Ex Taq	1.25 U
滅菌蒸留水	up to 50 μl

(軽くタッピングして混合)

98℃ 10 sec.
55℃ 30 sec.
72℃ 1 min./kb
] 30 cycles

★PrimeSTAR®などα型のPCR酵素では、3'末端にdAが付加しないので注意が必要(次ページ参照)。

↓

②アガロースゲル電気泳動により、想定される大きさの目的のDNA断片が増幅していることを確認する。

↓

③NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて、PCR反応液から残存するプライマーや塩基を除いてDNAを精製する(10ページを参照)。

↓

④回収した溶液をインサートDNA溶液とする。

★②で目的以外のDNA断片も観察された場合には、アガロースゲルから目的DNA断片のバンドを切り出して、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて精製する必要がある。

2.Tベクターとのライゲーション

Mighty TA-cloning Kit使用の場合

①新しいチューブに以下を用意する。

滅菌蒸留水	3 μl
pMD20-T Vector	1 μl (50 ng)
PCR産物 (インサートDNA溶液)	1 μl

↓

②Ligation Mighty Mixを5 μl加え、穏やかに混合

↓

③16℃で30分間インキュベートする。

3.形質転換

E. coli HST08 Premium Competent Cells使用の場合

①HST08コンピテントセル100 μlを使用直前に氷上で融解して穏やかに混和後、14 ml 丸底チューブに移す(ボルテックス不可)。

↓

②ライゲーション反応後の溶液10 μlを加え、氷中30分間放置

↓

③42℃で 45秒間インキュベート後、氷中1〜2分間放置

↓

④あらかじめ37℃に保温したSOC培地を最終1 mlになるように加える。

↓

⑤37℃で1時間振とう(160〜225 rpm)

↓

⑥LB選択プレート(LB+Amp+X-Gal)に適当量まき、37℃で一晩静置

↓

⑦青/白判定で白コロニーを候補とする。

★*E. coli* JM109を使用する場合はアンピシリン、X-Gal、IPTGを含むLBプレートに塗布する。37℃で一晩培養し、青/白判定で白コロニーを候補とする。

4.インサートチェックPCR

EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix使用の場合

①新しいチューブに以下を用意する。

EmeraldAmp MAX PCR Master Mix(2×Premix)	25 μl
Forward Primer	0.2 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2 μM (final conc.)
滅菌蒸留水	up to 50 μl

↓

②プレート上のコロニーをチップの先でごく少量掻き取り、上記のPCR反応液に懸濁して増幅する。

98℃ 10 sec.
60℃ 30 sec.
72℃ 1 min./kb
] 30 cycles

↓

③PCR反応液を一部アガロースゲル電気泳動に供し、インサートを確認する。

5.培養、プラスミド精製

①目的のプラスミドを持つことを確認したコロニーを取り、LB+Amp培地2 mlに加えて一晩振とう培養する。

↓

②NucleoSpin® Plasmid EasyPure 等を用いてプラスミドDNAを精製する。(精製手順は10ページ参照)

★精製したプラスミドDNAの構造を、制限酵素処理・アガロースゲル電気泳動により確認すると良い。

PCR酵素の種類と末端形状

PCR用DNAポリメラーゼは大きく2つのタイプに分けられます。*Taq* DNA Polymeraseをはじめとする Pol I型(family A)酵素と、*Pfu* DNA Polymeraseに代表されるα型(family B)酵素です。

Pol I型DNAポリメラーゼおよびPol I型をベースとする改良型PCR酵素(*TaKaRa Ex Taq*®など)の増幅産物のほとんどは、その3'末端にデオキシアデノシン(dA)が一塩基付加されています。これを利用してPCR産物をそのままTAクローニングに使用可能です。

一方、α型DNAポリメラーゼによる増幅産物のほとんどは、酵素自身がもつ強力な3'→5'exonuclease活性により平滑末端となっており、そのままではTAクローニングに使用できません。平滑末端のPCR産物をTAクローニングに用いる場合には、3'末端にdAを付加する必要があります。

タカラバイオでは、通常のTAクローニング用試薬「Mighty TA-cloning Kit」に加え、α型DNAポリメラーゼによる増幅産物専用のTAクローニング用試薬「Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®」をご用意しています。本キットには平滑末端をもつPCR増幅産物の3'末端にdAを付加するためのA-overhang mixtureが添付されており、簡便な操作でTAクローニングが可能です。

PCR酵素のタイプ	Pol I型 (family A)	α型 (family B)
増幅産物の3'末端の形状	dAが付加される (TAクローニング可)	平滑末端
酵素名	*TaKaRa Ex Taq*® *TaKaRa LA Taq*® *TaKaRa Taq*™ MigythAmp®シリーズ EmeraldAmp® MAX SapphireAmp® SpeedSTAR®	PrimeSTAR® シリーズ Tks Gflex®

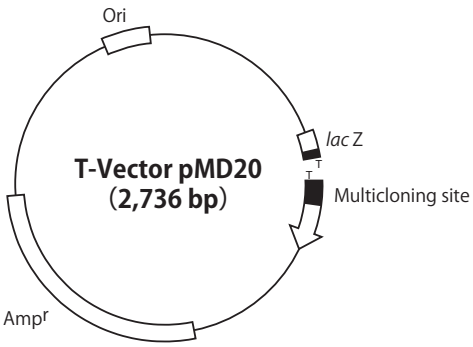
Tベクターについて

TA-cloning Kitの他にも、2種類のTベクター、T-Vector pMD20およびT-Vector pMD19(Simple)を販売しています。いずれも形質転換体の青／白選択が可能です。
T-Vector pMD19(Simple)ではpUC19に由来するマルチクローニングサイト上のすべての制限酵素サイトが除去されているため、クローニング後にインサート部分の制限酵素サイトを利用する場合に便利です。

5 kb以上のPCR産物のクローニング

長鎖のPCR産物(5 kb以上)の場合、TAクローニング効率が低下するため、平滑末端クローニングをお勧めします。末端平滑化およびリン酸化のための簡便な前処理用試薬を含むMighty Cloning Reagent Set (Blunt End)(製品コード 6027)の使用が便利です。

PrimeSTAR®シリーズなどα型ポリメラーゼで増幅した平滑末端のPCR産物をリン酸化して平滑末端クローニングを行う場合にも、Mighty Cloning Reagent Set(Blunt End)をご利用ください。



【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TAクローニングキットおよびTベクター	Mighty TA-cloning Kit	20回	6028	¥22,000
	Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®	20回	6019	¥33,000
	T-Vector pMD20	1 μg	3270	¥10,000
	T-Vector pMD19(Simple)	1 μg	3271	¥10,000
平滑末端クローニングキット	Mighty Cloning Reagent Set(Blunt End)	20回	6027	¥30,000
形質転換用コンピテントセル	*E. coli* HST08 Premium Competent Cells	1 Set(100 μl × 10)	9128	¥22,000
	E. coli JM109 Competent Cells	1 Set(100 μl × 10)	9052	¥20,000
	E. coli DH5α Competent Cells	1 Set(100 μl × 10)	9057	¥20,000
インサートチェックPCR	EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix	160回	RR320A	¥6,700
DNAクリーンアップ	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ※	10回	740609.10	¥5,300
プラスミド精製	NucleoSpin® Plasmid EasyPure ※	10回	740727.10	¥4,200
電気泳動	Agarose L03「TAKARA」	100 g	5003	¥17,000
	100 bp DNA Ladder(Dye Plus)	500 μl(100回)	3422A	¥19,000
	λ-*Hin*d III digest	100 μg	3403	¥8,500

★各PCR酵素については、タカラバイオウェブサイトでご確認ください。

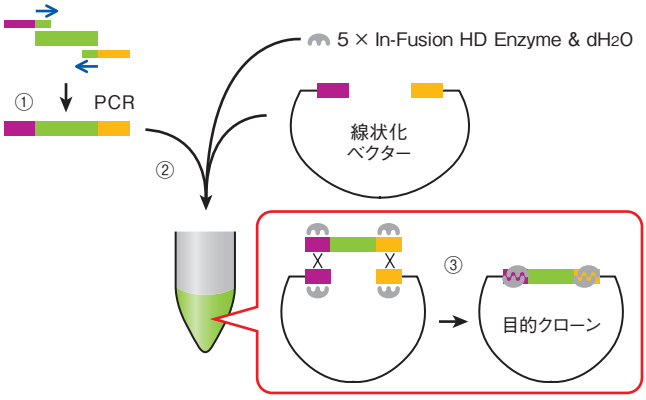
※マッハライ・ナーゲル社の製品です。

In-Fusion クローニング

ClontechのIn-Fusion酵素を用いてDNA断片同士の末端15塩基の相同配列を融合させることでクローニングを行います。使用する任意のベクターの末端配列を利用してクローニングを行うため、あらゆるベクターが使用でき、余分な配列が一切付加されず、しかも定方向クローニングを行うことができる優れた手法です。

原理と特長

- インサートの種類、クローニング部位、ベクターを選ばずディレクショナルにクローニング
- 短鎖から長鎖（50 bp～15 kb）まで効率よくクローニング可能
- 1回の反応で、複数DNA断片の同時クローニングも可能
- In-Fusion反応はわずか15分で完了



①In-Fusion酵素は、DNA断片の末端15塩基の相同配列を融合するため、ベクター上のクローニングしたい位置の両側15塩基とそれぞれ相補的な配列を付加したプライマーで目的遺伝子をPCR増幅する。

②制限酵素処理またはインバースPCRにより線状化ベクターを用意し、①のPCR産物※とIn-Fusion酵素を混合する。
※非特異的な増幅がある場合にはスピンカラム精製を、シングルバンドの場合はCloning Enhancer処理を行って使用してください。

③50℃15分のIn-Fusion反応によりシームレスかつ定方向にクローニングが完了

操作方法の概要

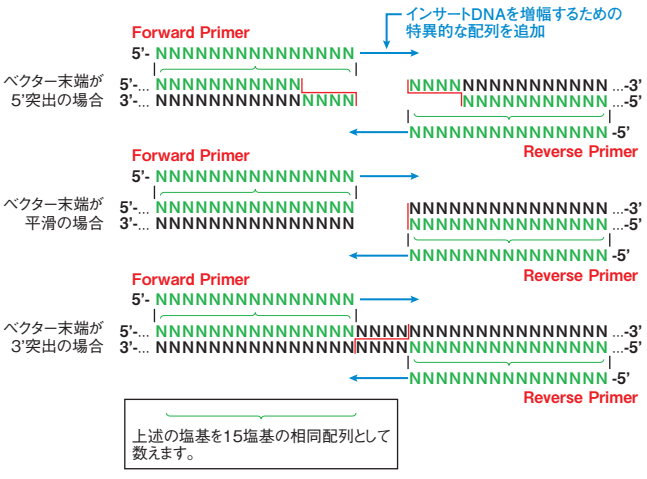
（プロトコールの詳細については必ず取扱説明書を確認してください。）

1.線状化ベクターおよびインサートDNAの調製

①使用するベクターとクローニング部位を決定し、制限酵素処理またはインバースPCRによりベクターを線状化する。
…線状化ベクター溶液[A]

↓

②インサートDNAのPCR増幅のためのIn-Fusion Primerを設計する。



In-Fusion酵素は、各DNA断片の末端15塩基の相同配列を認識してこれを融合させます。このため目的インサートをPCR増幅する場合には、使用する線状化ベクターの末端配列に相同な15塩基を、配列特異的プライマーの5'末端に付加することがポイントです。上図のように線状化ベクターの末端形状に合わせて、In-Fusion Primerを設計してください。なお、In-Fusion Cloning反応は増幅産物のA-overhangの有無による影響を受けないため、PCR増幅産物のA-overhangを考慮する必要はありません。
In-Fusion Primerの設計にはオンラインツールの使用が便利です⇒⇒

↓

③インサートDNAをPCR増幅する。
（PrimeSTAR® Max DNA Polymeraseを用いた場合）

PrimeSTAR Max Premix（2×）	25 μl
Forward Primer	0.2～0.3 μM
Reverse Primer	0.2～0.3 μM
Template	< 200 ng
Sterile deionized H_2O	up to 50 μl

98℃ 10 sec. 55℃ 5 sec. または15 sec. 72℃ 5 sec./kb	30～35 cycles

! 便利なオンラインツール

In-Fusionクローニング用のプライマー設計ツール、実験例紹介、各種ガイド、学習ツールなど、役立つ情報を多数掲載しています。

http://www.takara-bio.co.jp/infusion-tool/

2.アガロースゲル電気泳動でPCR増幅産物を確認

①電気泳動の結果に応じて、以下のようにインサートDNAを処理する。

●増幅産物に**非特異的な増幅**が認められた場合：
目的バンドのみを切り出し、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-upを用いてスピンカラム精製を行う。

●増幅産物が**シングルバンド**の場合はCloning Enhancer処理を推奨：

PCR反応液	5 μl
Cloning Enhancer	2 μl

37℃ 15分→80℃ 15分

↓

②インサートDNA溶液[B]とする。

3. In-Fusion Cloning反応

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μl
線状化ベクター[A]	x μl
精製済／CE処理済みPCR断片[B]	y μl
dH_2O	up to 10 μl

50℃、15分反応→氷上静置

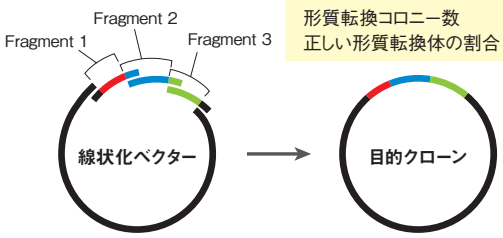
4.大腸菌への形質転換

Stellar™ Competent Cells（製品コード 636763）や*E. coli* HST08 Premium Competent Cells（製品コード 9128）など、形質転換効率が1×10^8 cfu/μgプラスミドDNA以上のコンピテントセルの使用を推奨します。

5.インサートチェックPCR、培養、プラスミド精製

インサートチェックPCRは5ページを、プラスミド精製は10ページを参照

! 複数DNA断片のマルチクローニング



形質転換コロニー数	415
正しい形質転換体の割合	7/10

In-Fusion Cloningならマルチクローニングも効率よく行うことができます。各1 kbのDNA断片をIn-Fusion® HD Cloning Kitを用いてクローニングし、コロニーPCRによりインサートを確認したところ、10クローン中7クローンで正しい挿入が確認できました。

【関連製品リスト】 10回包装（EcoDry™タイプは8回包装）

製品名	製品コード	価格（税別）	キット付属品				
			Cloning Enhancer	精製用カラム NucleoSpin	Steller Competent Cell	CloneAmp HiFi PCR Premix	
In-Fusion® HD Cloning Kit ※	639648	¥23,000	—	—	—	—	すでにタカラバイオの高正確性PCR酵素「PrimeSTARシリーズ」をお使いの方はこちらがおススメです。
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer ※	639633	¥24,000	●	—	—	—	
In-Fusion® HD Cloning Kit w/NucleoSpin® ※	639639	¥26,000	—	●	—	—	
In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit ※	639689	¥23,000	—	—	—	—	
In-Fusion® HD Cloning Plus ※	638909	￥47,400	—	●	●	●	初めてIn-Fusionキットを使用される方、特にオールインワンキットをご要望の方はこちらをどうぞ！
In-Fusion® HD Cloning Plus CE ※	638916	￥45,300	●	—	●	●	

※プレミックス済み液体タイプのIn-Fusion® HDには、上記のほか、50回包装と100回包装があります。
※In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kitは、凍結乾燥タイプ（室温、デシケーター内保存可能）のIn-Fusion® HDキットです。マイクロチューブに分注済みのため直ちに使用することができます。24回タイプ（8連チューブ×3本）、96回タイプ（96ウェルプレート）もあります。

〈In-Fusion® HD添付製品〉

Cloning Enhancer

PCR産物がシングルバンドの場合に増幅産物をそのままIn-Fusion反応に用いるための前処理試薬。この処理により、PCRに使用したプライマーや鋳型プラスミド、dNTPの影響を受けず、In-Fusion酵素が最大のパフォーマンスを示すことができる。

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

PCR産物が複数バンドの場合にゲル精製を行うスピンカラム

Stellar™ Competent Cells

高い形質転換能を持つコンピテントセル。長鎖プラスミドDNAの形質転換においても高い効率が得られ、同様の遺伝子型を持つ他のコンピテントセルと比較してコロニー形成速度が速い。pUC系プラスミドでの形質転換の際には、β-ガラクトシダーゼのα-相補性を利用し、X-Gal添加による組換え体の青／白選別を行うことができる。

CloneAmp™ HiFi PCR Premix

正確性が極めて高いPCR酵素。In-Fusionクローニングにおいて、インサートDNAの増幅やPCRによるベクターの線状化に最適である。本製品は、In-Fusion® HD Cloning Plusシリーズに添付されている。

逆転写酵素＆cDNA合成

単離精製されたRNAから、RT-PCRやLibrary作製を行う場合、まず逆転写酵素（Reverse Transcriptate：RTase）でcDNA化する必要があります。ここでは、PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kitを用いてcDNA合成を行うための一般的なプロトコールを紹介します。

現在、研究用試薬として汎用されている逆転写酵素には、avian myeloblastosis virus（AMV）に由来するものと、moloney murine leukemia virus（M-MLV）に由来するものの2種類があります。従来、mRNA高次構造の影響を回避する手段として熱安定性が高いAMV RTaseが使用されていましたが、近年、MMLV由来の改良型逆転写酵素（PrimeScript®シリーズなど）の性能が向上したため、こちらが主流になりつつあります。

なお、逆転写酵素を用いたcDNA合成では、RNA上に反応開始位置となるプライマーをアニールさせますが、このプライマーには使用目的の違いから、以下の3種類が用いられます。

1. オリゴdTプライマー：mRNAのpolyA tailにアニールさせ、3'側からcDNAを合成します。
2. ランダムプライマー（通常、6塩基から9塩基程度）：mRNA、rRNA等すべてのRNAからcDNAを合成します。
3. 既知の配列特異的なプライマー：特定のcDNAのみを合成します。

操作方法の概要

1st strand cDNA合成

PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit 使用の場合

①マイクロチューブ内に以下の鋳型RNA/Primer混合液を調製する。

Oligo dT Primer（50 μM）	1 μl
（or Random 6mers（50 μM）	1 μl ）
（or Gene Specific Primer	2 pmol ）
dNTP mixture（10 mM each）	1 μl
鋳型RNA	total RNA：≦5 μg
	（or polyA RNA：≦1 μg ）
RNase free dH_2O	up to 10 μl

↓

②65℃で5分間保温した後、氷上で急冷する。

↓

③以下の反応液を加え、全量を20 μlにする。

上記鋳型RNA/Primer Mixture	10 μl
5 × PrimeScript II Buffer	4 μl
RNase Inhibitor（40 U/μl）	0.5 μl
PrimeScript II RTase（200 U/μl）	1 μl
RNase free dH_2O	up to 20 μl

↓

④軽く撹拌する。

↓

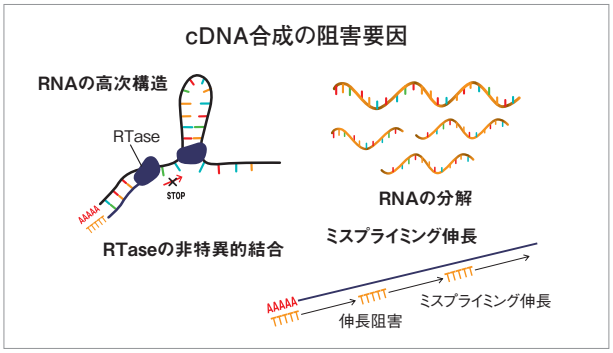
⑤以下の条件で反応する。

（ 30℃ 10 min.）　※Random 6mersを用いた場合に必要
42℃ 30～60 min.

↓

⑥95℃で5分間保温した後、氷上で冷却する。

cDNA合成の阻害要因を克服



cDNA合成を行う際には、RNAの高次構造や分解、RTase自身のRNAへの非特異的な結合、氷上放置による伸長阻害などがしばしば問題となります。

PrimeScript® II RTaseは、もともと優れた性能を持つ逆転写酵素PrimeScript®と独自のアクセサリータンパク質の添加により、これらの阻害要因を克服しました。

PrimeScript® RTase
- ☑ 高次構造をとるRNAに強い
- ☑ 42℃反応でRNAのダメージを抑制

＋

アクセサリータンパク質
- ☑ RTase自身のRNAへの非特異的結合を抑制
- ☑ 氷上放置による伸長阻害を抑制

【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格（税別）
最高品質の1st strand cDNAの合成に推奨	PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit	50回	6210A	¥35,000
高正確性PCR酵素と組み合わせたRT-PCRキット	PrimeScript® II High Fidelity RT-PCR Kit	50回	R023A	¥50,000
	PrimeScript® II High Fidelity One Step RT-PCR Kit	50回	R026A	¥50,000

核酸の精製

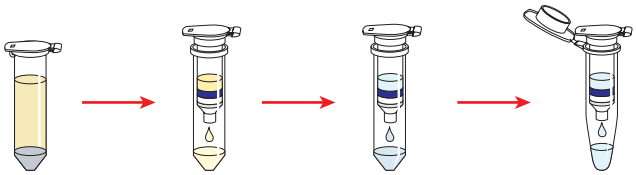
PCR反応後のプライマー除去、アガロースゲルからのDNA回収、プラスミドDNA精製など、クローニングの様々な場面で迅速・簡便かつ高純度に核酸精製を行うためにスピンカラムタイプの核酸精製キットを使用します。
ここでは、シリカメンブレンスピンカラムを使用したDNAの精製方法を紹介します。

操作方法の概要

プラスミドDNAの精製

NucleoSpin® Plasmid EasyPure使用の場合

①大腸菌培養液（高コピープラスミド：2～10 ml）を遠心分離（12,000 × *g*、30秒）し、上清を捨ててペレットを得る。
↓
②A1バッファー（＋RNase A）150 µlを加え、Vortexで菌体を懸濁する。
↓
③A2バッファー250 µlを加え、5回ほど転倒混和後、2分静置する。【溶菌】
↓
④A3バッファー350 µlを加え、液体の色が青色から完全に無色に変わるまで転倒混和する。青色が残っていないことを確認し、遠心分離（12,000 × *g*、3分）を行う。
↓
⑤上清をNucleoSpin® Plasmid EasyPureカラムに移して遠心（1,000～2,000 × *g*、30秒）する。【結合】
↓
⑥AQバッファー（+EtOH）450 µlを加えて、遠心（12,000 × *g*、1分）する。【洗浄／乾燥】
↓
⑦AEバッファー50 µlをカラムに加えて室温で1分置く。
↓
⑧遠心（12,000 × *g*、1分）によりプラスミド溶液を回収する。【溶出】

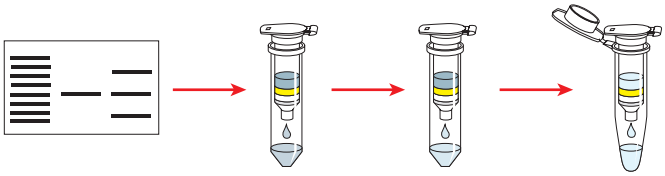


溶菌　結合　洗浄／乾燥　溶出

アガロースゲルからDNAを精製

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up使用の場合

①ゲル100 mgにNTIバッファー200 µlを加え、50℃10分インキュベートしてゲルを溶解する。
↓
②NucleoSpin®カラムに溶液を移して遠心（11,000 × *g*、30秒）する。【結合】
↓
③NT3バッファー（＋EtOH）700 µlを加えて遠心（11,000 × *g*、30秒）する。【洗浄】
↓
④カラムのメンブレンを乾燥（11,000 × *g*、1分）する。
↓
⑤NEバッファー（15～30 µl）をカラムに加えて室温で1分静置後、遠心（11,000 × *g*、1分）する。【溶出】



アガロースゲル　結合　洗浄、乾燥　溶出

★NucleoSpin® Gel and PCR Clean-upは、同じバッファーを用いてPCR産物のクリーンアップにも使用可能です。
PCR反応液100 µl（必要に応じて滅菌蒸留水を加え100 µlとする）にNTIバッファー200 µlを加えて混合し、上記の②以降のステップを行ってください。

チェックポイント

陰イオン交換クロマトグラフィー（NucleoBond®シリーズ）

核酸は、低pH条件下でプラスにチャージしたイオン交換基に結合するが、高pH・高塩濃度条件にするとイオン交換基から解離する。これにより、核酸を高純度に精製することができる。
（→トランスフェクショングレードのプラスミドDNA精製など）

シリカメンブレンスピンカラム（NucleoSpin®シリーズ）

高濃度のカオトロピック塩を含むBinding Bufferと混合した核酸は、水和水が奪われた状態となりシリカメンブレンに結合するが、低塩濃度のElution Bufferを加えると核酸は再び水和水を獲得し、シリカメンブレンから解離して溶出される。シリカメンブレンの使用により、簡便かつ低コストでDNA精製を行うことができる。

【関連製品リスト】

下記リストの製品は、マッハライ・ナーゲル社の製品です。

	製品名	容量	製品コード	価格（税別）
プラスミドDNAミニプレップ	NucleoSpin® Plasmid	50回	740588.50	￥10,700
		250回	740588.250	￥50,000
	NucleoSpin® Plasmid EasyPure	50回	740727.50	¥10,500
		250回	740727.250	¥36,700
トランスフェクショングレードのプラスミドDNA精製（EFはエンドトキシンフリー）	NucleoBond® Xtra Midi	10回	740410.10	¥13,700
	NucleoBond® Xtra Midi EF	10回	740420.10	￥21,900
PCR産物のクリーンアップとゲル抽出の両方に使用可能	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	50回	740609.50	¥12,500
		250回	740609.250	¥45,000
細胞・組織などからのtotal RNA精製	NucleoSpin® RNA	50回	740955.50	¥33,500

アガロースゲル電気泳動

クローニング実験において、DNAの検出、定量は欠くことのできない操作です。その中でもアガロースゲル電気泳動によるDNA検出は日常的におこなわれる手法です。ここではアガロースゲル作製を中心に紹介します。

操作方法の概要

1. アガロースゲルの作製（1%ゲル、150 ml作製の場合）

①アガロース粉末を1.5 g量り取る。
②適切な大きさの容器中*1で、室温または冷却したバッファー*2 150 mlを攪拌しながらアガロース粉末を加える。（容器全体の重量を量って記録しておく。）
③ラップで覆った後蒸気抜きの穴を開け、電子レンジにセットし加熱する。時々とめて攪拌し、完全に溶解する*3。
④加熱終了後電子レンジから出し、静かに攪拌して均一にし泡を取り除く。（必要に応じて再び重量を量り、温めた蒸留水を加えて蒸発した水分を補う。）
⑤溶液を室温に置いて50～60℃まで冷却し、コームをセットしたゲルトレイに流し入れる。ピペットチップなどで泡を取り除き、冷やし固める。
⑥適量のバッファーを重層後コームを外し、泳動槽に移す。（すぐに使用しない場合は、バッファーを満たした容器に入れ冷暗所保存する。）

2. 電気泳動サンプルの準備

泳動サンプル溶液に1/10量の10 × Loading Bufferを加えてよく混合する。DNA分子量マーカーも同様に準備する。
ゲルのウェルにサンプル溶液をアプライする。

3. 電気泳動

泳動装置（パワーサプライ）のスイッチを入れて電気泳動を開始する。電流の向きに注意する（泳動上流側に陰極、下流側に陽極をセットする）。適度に分離した時点でスイッチを切る。

4. ゲルの染色

泳動後のゲルをエチジウムブロマイド（EtBr）、SYBR® Green Iなどの染色液に浸す。

*1 三角フラスコでもよいが、溶液の2～5倍容量のビーカーを使うことで突沸を防止できる。3%以上の高濃度ゲルを調製するときは、さらに大きな容器を使うことをお勧めする。

*2 3%以上の高濃度ゲルを調製する際アガロース粒子がバッファーに分散しにくい場合があるが、あらかじめバッファーを氷上で10分間ほど冷却しておくと分散しやすくなる。

*3 電子レンジで加熱する際は、容器全体が過熱し激しく沸騰することがあるので充分に注意が必要である。また、火傷を防ぐためにholderや断熱性手袋を使用することが望ましい。

〈アガロースの種類と濃度の選択〉

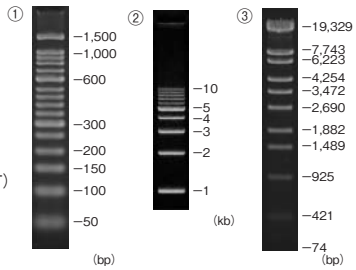
分離範囲	推奨アガロース	ゲル濃度
500 bp未満	PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve など	3%
500～5,000 bp	Agarose L03、PrimeGel™ Agarose LE 1-20Kなど	1%
5,000 bp以上	PrimeGel™ Agarose LE 3-40K	0.5%

〈DNA分子量マーカーの泳動図〉

①50 bp DNA Ladder
（3% PrimeGel Agarose PCR-Sieve）

②1 kb DNA Ladder
（1% Agarose L03）

③λ –*Eco*T14 I digest
（1% PrimeGel Agarose LE 1-20K GAT）



【関連製品リスト】

	製品名	概要	容量	製品コード	価格（税別）
アガロース各種	Agarose L03「TAKARA」	1 kb以上の核酸の分離に	100 g	5003	¥17,000
	PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT	1 kb以上の核酸の分離・回収に（高品質タイプ）	100 g	5801A	¥34,000
	PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve	PCR増幅産物など1 kb以下の核酸の分離に	100 g	5810A	¥48,000
バッファーパウダー	Tris-Acetate-EDTA Buffer（TAE）50 × Powder, pH8.3	1包を蒸留水に溶解して1 Lの50 × TAEを作製	1包	T9131	¥16,000
	Tris-Borate-EDTA Buffer（TBE）Powder, pH8.3	1包を蒸留水に溶解して1 LのTBEを作製	10包	T9121	¥10,000
分子量マーカー	100 bp DNA Ladder（Dye Plus）	100～1,500 bpの11本のバンド	500 μl（100回）	3422A	¥19,000
	1 kb DNA Ladder（Dye Plus）	1～10 kbの10本のバンド	500 μl（100回）	3426A	¥13,000
電気泳動装置	Mupid®-2plus ※	スタンダードモデル	一式	M-2P	¥40,760
	Mupid®-exU ※	高機能モデル	一式	EXU-1	¥56,950

※アドバンス社の製品です。

In-Fusion Cloning Products : This product is covered by U.S. Patent No. 7,575,860 and European Patent No. EP1741787.
その他のライセンス（最新のライセンス情報）に関しては弊社ウェブサイトにてご確認ください。

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・本パンフレットに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
・本パンフレット記載の価格は2014年4月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

東京支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995

TaKaRa テクニカルサポートライン
TEL 077-543-6116　FAX 077-543-1977

Website　http://www.takara-bio.co.jp
Facebook　http://www.facebook.com/takarabio.jp

取扱店

2014年3月作成36K